

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 6 月 20 日 (20.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/48400 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68, 1/48, (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人 名古屋産業科学研究所 (NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒460-0008 愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号 Aichi (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/10813
- (22) 国際出願日: 2001 年 12 月 10 日 (10.12.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (72) 発明者; および
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 長谷川好規 (HASEGAWA, Yoshinori) [JP/JP]; 〒464-0039 愛知県名古屋市中千種区日和町4丁目29の302号 Aichi (JP). 安藤雄一 (ANDO, Yu-uichi) [JP/JP]; 〒503-0015 岐阜県大垣市林町7-624-1 Gifu (JP). 下方 薫 (SHIMOKATA, JP).
- (30) 優先権データ:
特願 2000-376756
2000 年 12 月 12 日 (12.12.2000) JP

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ESTIMATING RISK OF THE EXPRESSION OF SIDE EFFECT CAUSED BY THE ADMINISTRATION OF COMPOUND METABOLIZED, EITHER PER SE OR AS ITS METABOLIC INTERMEDIATE, BY UGT1A1 ENZYME

(54) 発明の名称: UGT1A1酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法

遺伝子型 ^a		白血球減少症 (グレード 4) 及び / 又は 下痢 (グレード 3 以上) ^b			
TATA 971 ^c	コドン 71 ^d	コドン 229 ^e	経験者 ^f	非経験者 ^g	
UGT1A1*28	UGT1A1*6	UGT1A1*27	(N = 26)	(N = 92)	
6 / 6			14 (54%)	79 (86%)	
6 / 6	Gly / Gly	Pro / Pro	11	57	
6 / 6	Gly / Arg	Pro / Pro	3	20	
6 / 6	Arg / Arg	Pro / Pro	0	2	— D
6 / 7			8 (31%)	10 (11%)	
6 / 7	Gly / Gly	Pro / Pro	6	9	
6 / 7	Gly / Arg	Pro / Pro	1	— A	
6 / 7	Gly / Gly	Pro / Gln	1	— B	0
7 / 7			4 (15%)	3 (3%)	
7 / 7	Gly / Gly	Pro / Pro	2	3	
7 / 7	Gly / Gly	Pro / Gln	2	— C	0
全ビリルビンレベル (μmol/liter) ^h					
治療前 ⁱ			8.6 (6.8-13.7)	8.6 (6.8-12.0)	
投与後の最高値 ^j			16.2 (11.8-26.5)	13.7 (10.3-18.8)	

a... GENOTYPE
b... LEUKOPENIA (GRADE 4) AND/OR DIARRHEA (GRADE 3 OR MORE)^a
c... TATA BOX
d... CODON 71
e... CODON 229
f... EXPERIENCED
g... NON-EXPERIENCED
h... TOTAL BILIRUBIN LEVEL (μmol/liter)^a
i... BEFORE TREATMENT
j... MAXIMUM LEVEL AFTER ADMINISTRATION

(57) Abstract: A method of estimating a risk of the expression of a side effect caused by the administration of irinotecan; and a method of relieving the side effect caused by the administration of irinotecan. A polymorphism on the basis of a difference in the repeating numbers of TA repetitive sequences in the promoter domain of UGT1A1 gene and two types of polymorphisms (bases at the 211- and 686-positions) on the basis of single nucleotide polymorphisms in the exon 1 are analyzed. Based on the analytical data, the risk of the expression of a side effect caused by the administration of irinotecan is estimated. Further, the administration doses of irinotecan is designed for individual patients depending on the risk of the expression of the side effect, thereby relieving the side effect caused by the administration of irinotecan.

WO 02/48400 A1

[続葉有]



Kaoru) [JP/JP]; 〒463-0011 愛知県名古屋市守山区小幡北山2773-83 Aichi (JP).

(74) 代理人: 萩野幹治 (HAGINO, Mikiharu); 〒509-0125 岐阜県各務原市鵜沼南町7丁目41番地 Gifu (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

イリノテカンの投与による副作用発現リスクを予測する方法を提供する。また、イリノテカンの投与による副作用を低減させる方法を提供する。

T1A1遺伝子のプロモータ領域におけるTA反復配列の反復数の違いによる多型、及びエクソン1内の一塩基置換による二種類の多型（211位の塩基、及び686位の塩基）を解析する。解析結果に基づきイリノテカン投与による副作用発現リスクを予測する。また、副作用発現リスクに応じて患者毎にイリノテカン投与量を設定し、イリノテカン投与による副作用を低減させる。

明 細 書

UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法

5

技術分野

本発明は、薬物の代謝に関与する酵素をコードする遺伝子の多型を解析することにより、薬物の副作用発現リスクを予測する方法に関する。また、副作用発現リスクを予測するために用いられるキットに関する。さらに、副作用発現リスク

10 の予測結果に基づき薬物の副作用発現リスクを低減する方法に関する。

詳しくは、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT)をコードする遺伝子の多型を分析することにより、UGT によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法及び副作用発現リスク予測用キット、並びに副作用発現リスクを低減する方法に関する。

15

背景技術

ヒトには2種類のUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT)酵素、即ちUGT1とUGT2が存在する。UGT1ファミリーは、スプライシングにより共通のエクソン2に連結される各プロモータ及びエクソン1を伴う遺伝子群から構成される(Ritter, J. K., Chen, F., Sheen, Y. Y., Tran, H. M., Kimura, S.,

20 Yeatman, M. T., and Owens, I. S., J. Biol. Chem., 267: 3257-3261, 1992)。従って、その基質特異性はエクソン1に依存している。

UGT1ファミリーの一つであるUGT1A1遺伝子は、プロモータ及びエクソン2～5に近接するエクソン1から構成される。UGT1A1酵素は、主としてビリルビンの抱合を担い、薬剤(エチニルエストラジオール等)、生体異物化合物(フェノ

25

ール、アントラキノン、フラボン等)、内因性ステロイドをグルクロニド化することが
とができる (Senafi, S. B., Clarke, D. J., Burchell, B., *Biochem. J.*, 303: 233-240,
1994)。現在のところ、プロモータ領域とエクソンにおける 30 以上の遺伝子多
型が UGT1A1 酵素活性を低下させて体質性非抱合黄疸、クリグラールナジャー症
5 候群、ギルバート症候群を引き起こすことが知られている (Mackenzie, P. I., et
al., *Pharmacogenetics*, 7: 255-269, 1997)。最近の *in vitro* 分析により、UGT1A1
のアイソフォームが SN-38 のグルクロニド化を担うこと、及び遺伝子多型がビリ
ルビンの場合と同様に SN-38 のグルクロニド化活性の減少に関与することが示
唆された (Iyer, L., et al., *J. Clin. Invest.*, 101: 847-854, 1998, Iyer, L., et al.,
10 *Clin. Pharmacol. Ther.*, 65: 576-582, 1999)。また、本発明者らは、UGT1A1 遺
伝子型に依存した SN-38 及び SN-38 グルクロニドの薬物動態学的個人差を指摘
した (Ando, Y., Saka, H., Asai, G., Sugiura, S., Shimokata, K., and Kamataki,
T., *Ann. Oncol.*, 9: 845-847, 1998)。

UGT1A1 酵素によりその中間代謝物が代謝 (抱合) される化合物の一つにイ
15 リノテカン (CPT-11) がある。イリノテカンは、カルボキシルエステラーゼによ
り代謝されて活性型 SN-38 となる。SN-38 は、さらに UGT1A1 に抱合、解毒化
されてその β -グルクロニドとなる。その後、胆汁を介して小腸で排泄され、細菌
由来グルクロニダーゼにより SN-38 とグルクロン酸に分解される (Takasuna, K.,
Hagiwara, T., Hirohashi, M., Kato, M., Nomura, M., Nagai, E., Yokoi, T., and
20 Kamataki, T., *Cancer Res.*, 56: 3752-3757, 1996)。SN-38 については、その薬
物動態学的個人差により、薬物の効果の変動が引き起こされる可能性が示唆され
ている (Gupta, E., Lestingi, T. M., Mick, R., Ramirez, J., Vokes, E. E., and
Ratain, M. J., *Cancer Res.*, 54: 3723-3725, 1994, Kudoh, S., Fukuoka, M.,
Masuda, N., Yoshikawa, A., Kusunoki, Y., Matsui, K., Negoro, S., Takifuji, N.,
25 Nakagawa, K., Hirashima, T., Yana, T., and Takada, M., *Jap. J. Cancer Res.*,

86: 406-413, 1995)。

- イリノテカン、カンプトテシン類似化合物の一つであって、トポイソメラーゼ I を抑制することによる強い抗腫瘍活性を有することで知られている。イリノテカンは、特に結腸癌や肺癌の治療薬として広範に使用されているが、白血球の減少、下痢といった副作用が報告されており、その投与薬剤の用量規定因子 (dose limiting toxicity) が問題とされる (Negoro, S. et al., J. Natl. Cancer Inst., 83: 1164-1168, 1991, Akabayashi, A., Lancet, 350: 124, 1997, Pharmaceuticals and Cosmetics Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare (ed), Summary Basis of Approval (SBA) No.1 (revised edition): irinotecan hydrochloride. Tokyo: Yakuji Nippo, Ltd., 1996)。イリノテカンの副作用は、時として致死的なものであり (Rougier, P. et al., Lancet, 352: 1407-1412, 1998, Kudoh, S. et al., J. Clin. Oncol., 16: 1068-1674, 1998, Masuda, N. et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 18: 459a, 1999, Negoro, S. et al., J. Natl. Cancer Inst., 83: 1164-1168, 1991)、実際、臨床試験中に、1245 名中 55 名の患者がイリノテカンの副作用により亡くなっているとの報告がある (Akabayashi, A., Lancet, 350: 124, 1997, Pharmaceuticals and Cosmetics Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare (ed), Summary Basis of Approval (SBA) No.1 (revised edition): irinotecan hydrochloride. Tokyo: Yakuji Nippo, Ltd., 1996)。
- 尚、Ratain らは、UGT の活性を上昇させる化合物を用いることにより、イリノテカンの副作用を低減させる方法を提案している (米国特許第 5786344 号)。

発明の開示

- 以上のように、UGT1A1 酵素が代謝に関与する薬剤の副作用は深刻な問題で

ある。しかしながら、かかる副作用を予測する有効な手段は知られていない。一方、癌の化学療法においては、多くの場合治療指標が限られるので、薬剤の副作用を低減し、かつその効果を高めるために、各個人に応じた薬剤投与量を設定することが非常に重要となる。

- 5 このような状況に鑑み、本発明は、イリノテカンに代表される、それ自体又は中間代謝物が UGT1A1 酵素に代謝される化合物の投与による副作用を低減させる画期的な手段を提供することを目的とする。即ち、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法、当該方法を利用したキット、及び当該化合物の副作用発現リスクを低減
- 10 させる方法を提供することを目的とする。

- 本発明者らは、以上の課題を解決すべく、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の多型に注目して研究を行った。具体的には、癌の化学療法においてイリノテカンの投与を受けた患者を対象に、UGT1A1 遺伝子の多型とイリノテカンの副作用との相関について調べた。特に、UGT1A1 遺伝子のプロモータ領域、エクソン 1、エクソン 4、及びエクソン 5 における多型について検討を行った。その結果、プロモータ領域における TA 反復配列の反復数の違いによる多型、及びエクソン 1 内の一塩基置換による二種類の多型（211 位の塩基、及び 686 位の塩基）とイリノテカンの副作用との間に相関が認められた。かかる知見より、UGT1A1 遺伝子におけるこれらの多型と、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物
- 15 の投与による副作用の程度との間に相関があることが示唆された。従って、UGT1A1 遺伝子のこれらの多型を解析することが、イリノテカンに代表される、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクの予測をするために有効な手段であると考えられた。特に、プロモータ領域における多型、及びエクソン 1 の 686 位の塩基置換による多型については、それ
- 20 ぞれ単独でイリノテカンの副作用との間に相関が認められ、従って、当該二つ
- 25

の多型の解析は、それぞれ単独でも UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクの予測をするために有効な手段であると考えられた。本発明は、以上の知見及び検討の結果に基づきなされたものであり、次の構成からなる。

5 1. UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法であって、少なくとも(a): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するステップを含む方法。

2. TA 反復配列数を解析するステップが、TA 反復配列数が 5 ないし 8 のいずれかであることを解析するステップである、1. に記載の方法。

3. TA 反復配列数を解析するステップが、TA 反復配列数が 6 または 7 であることを解析するステップである、1. に記載の方法。

4. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列領域を含む DNA を増幅するステップをさらに含む、1. ないし 3. のいずれかに記載の方法。

5. UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法であって、(b): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するステップ、及び／又は、(c): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するステップをさらに含む、1. ないし 4. のいずれかに記載の方法。

6. 686 位の塩基を解析するステップが、686 位の塩基がシトシンであるかまたはアデニンであるかを解析するステップである、5. に記載の方法。

7. 211 位の塩基を解析するステップが、211 位の塩基がグアニンであるかまたはアデニンであるかを解析するステップである、5. に記載の方法。

25 8. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含む DNA、及び／又

は UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を含む DNA、を増幅するステップをさらに含む、5. ないし 7. のいずれかに記載の方法。

9. UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法であって、少なくとも (b): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するステップを含む方法。

10. 686 位の塩基を解析するステップが、686 位の塩基がシトシンであるかまたはアデニンであるかを解析するステップである、9. に記載の方法。

11. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含む DNA を増幅するステップをさらに含む、9. 又は 10. に記載の方法。

12. 前記化合物は、カンプトテシン類似化合物である、ことを特徴とする 1. ないし 11. のいずれかに記載の方法。

13. 前記カンプトテシン類似化合物はカンプトテシン誘導体である、ことを特徴とする 12. に記載の方法。

14. 前記カンプトテシン誘導体は、トポテカン又はイリノテカンである、ことを特徴とする 13. に記載の方法。

15. 前記カンプトテシン誘導体は、イリノテカンである、ことを特徴とする 13. に記載の方法。

16. 1. ないし 15. のいずれかに記載の副作用発現リスクを予測する方法の結果に基づき前記化合物の投与量を設定するステップを含む、ことを特徴とする前記化合物の投与量設定方法。

17. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸であって、

- UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の TA 反復領域の塩基を含み、かつ配列番号 7 及び配列番号 8 のプライマーを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

18. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸であって、

UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の TA 反復領域の塩基を含み、かつ配列番号 9 及び配列番号 10 のプライマーを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

19. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸であって、

UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を含み、かつ配列番号 1 及び配列番号 2 のプライマーを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

20. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸であって、

UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含み、かつ配列番号 3 及び配列番号 4 のプライマーを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

21. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸を含む、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスク予測用キット。

22. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸、及び／又は、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸をさらに含む、21. に記載のキット。

23. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸を含む、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスク予測用キット。

24. 前記化合物は、カンプトテシン類似化合物である、ことを特徴とする 2

1. ないし 2 3. のいずれかに記載のキット。

2 5. 前記カンプトテシン類似化合物はカンプトテシン誘導体である、ことを特徴とする 2 4. に記載のキット。

2 6. 前記カンプトテシン誘導体は、トポテカン又はイリノテカンである、ことを特徴とする 2 5. に記載のキット。

2 7. 前記カンプトテシン誘導体は、イリノテカンである、ことを特徴とする 2 5. に記載のキット。

2 8. イリノテカンの副作用発現リスク予測用キットであって、少なくとも (a): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸、(b): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸、のいずれか 1 以上を含む、キット。

2 9. イリノテカンの副作用発現リスク予測用キットであって、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸、をさらに含む、2 8. に記載のキット。

3 0. イリノテカンの副作用発現リスク予測用キットであって、少なくとも (a): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸、(b): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸、のいずれか 1 以上を含み、さらに解析対象となる UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列領域を含む DNA、あるいは UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含む DNA を増幅するための試薬を含む、キット。

3 1. イリノテカンの副作用発現リスク予測用キットであって、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸及び UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を含む DNA を増幅するための試薬をさらに含む、3 0. に記載のキット。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例において解析される UGT1A1 遺伝子の多型をまとめた表である。
211G→A は 211 位におけるグアニンからアデニンへの置換、686C→A は 686 位にお
5 けるシトシンからアデニンへの置換、1099C→G は 1099 位におけるシトシンから
グアニンへの置換、1456T→G は 1456 位におけるチミンからグアニンへの置換を
それぞれ表す。また、G71R はコドン 71 におけるグリシンからアルギニンへの置
換、P229Q はコドン 229 におけるプロリンからグルタミンへの置換、R367G はコド
ン 367 におけるアルギニンからグリシンへの置換、Y486D はチロシンからアスパ
10 ラギン酸への置換をそれぞれ表す。

図 2 は、実施例において対象とされる患者の臨床情報をまとめた表である。a
は、日本癌治療学会の基準による。また、b は、カイ 2 乗テストの結果であり、
c は Mann-Whitney U テストの結果である。

図 3 は、実施例において対象とされる患者のイリノテカン化学療法の情報をま
15 とめた表である。a : 日本癌治療学会の基準、b : カイ 2 乗テスト、c : Fisher's
Exact test。

図 4 は、遺伝子型の分布を表にまとめたものである。6/6 は TA 反復配列が 6 の
アレルのホモ接合であること、6/7 は TA 反復配列が 6 のアレルと 7 のアレルとの
ヘテロ接合であること、7/7 は TA 反復配列が 7 のアレルのホモ接合であることを
20 それぞれ表す。Gly/Gly はコドン 71 がグリシンのアレルのホモ接合であること、
Gly/Arg はコドン 71 がグリシンのアレルとアルギニンのアレルとのヘテロ接合で
あること、Arg/Arg はコドン 71 がアルギニンのアレルのホモ接合であることをそ
れぞれ表す。Pro/Pro はコドン 229 がプロリンのアレルのホモ接合であること、
Pro/Gln はコドン 229 がプロリンのアレルとグルタミンのアレルとのヘテロ接合
25 であることをそれぞれ表す。a : 日本癌治療学会の基準、b : 平均値(四分位数間

領域)。

図 5 は、重篤副作用に対する UGT1A1*28 の影響と他の因子の影響を統計的に比較 (multiple logistic regression analysis) した結果を示した表である。a : 係数、b : イリノテカンと他の抗癌剤 (プラチナ製剤を除く) との組合せのレジ
5 ュメ。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、(a) : UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するステップを含む、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は
10 中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法に関する。

UGT1A1 酵素とは、UDP (ウリジンニリン酸) -グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) の一分子種である。UGT は生体においてビリルビンやステロイド等の内因性物質、特定の構造を有する薬剤等のグルクロン酸抱合 (グルクロニド抱合)
15 を触媒する酵素の総称であり、多くの薬剤の解毒化に関与する。UGT1A1 は、例えば、上述のようにイリノテカンの代謝に深く関与することで知られている。

UGT1A1 酵素をコードする遺伝子 (以下、「UGT1A1 遺伝子」という、GenBank Accession No.:AF297093) は、プロモータ領域、エクソン 1、エクソン 1 に続いて配置されるエクソン 2 ~ エクソン 5 を有する。プロモータ領域、エクソン 1 ~
20 エクソン 5 には複数の多型が存在することが知られている。

プロモータ領域における多型は、2 塩基ペア (TA) の反復配列 (TA 反復配列) 数の違いによるものであり、(TA)₆、(TA)₆、(TA)₇、及び (TA)₈ (TA 反復配列がそれぞれ 5、6、7、及び 8 存在する) と称される多型が存在する (Monaghan, G. et al., Lancet, 347: 578-581, 1996, Bosma, P. J. et al., N. Engl. J. Med., 333: 1171-1175, 1995, Lampe JW et al., Pharmacogenetics, 9, 341-349, 1999)。
25

本発明における、「TA 反復配列数を解析する」とは、被検遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列の数を分析すること（当該配列数が 5 ないし 8 のいずれかであること、当該配列数が 6 又は 7 であること、を解析すること含む）を意味する。

- 5 一方、(b) : UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するステップを含むことにより、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法を構成することができる。

- また、上記(a)のステップと上記(b)のステップを含むことにより本発明の方法
10 を構成することもできる。また、上記(a)のステップと(c) : UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するステップを含むことにより本発明の方法を構成することもできる。さらには、上記(a)のステップ、上記(b)のステップ、及び上記(c)のステップを含むことにより本発明の方法を構成することもできる。ここで、686 位の塩基とは、UGT1A1 遺伝子の転写開始点から下流方向に数えて 686
15 番目の塩基のことであり、同様に 211 位の塩基とは 211 番目の塩基である。

- ステップ(b)は、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するステップである。686 位の塩基には、シトシン (C) とアデニン (A) の二種類の多型が存在することが知られている(Aono, S. et al., Lancet, 345: 958-959, 1995)。従って、「UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析する」とは、特
20 に、686 位の塩基がシトシン又はアデニンのいずれかであることを分析することを意味する。

- ステップ(c)は、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するステップである。211 位の塩基には、グアニン (G) とアデニン (A) の二種類の多型が存在することが知られている(Aono, S. et al., Lancet, 345: 958-959, 1995)。
25 従って、「UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析する」とは、特

に、211 位の塩基がグアニン又はアデニンのいずれかであることを分析することを意味する。

尚、上記のプロモータ領域における TA 反復配列数の解析、686 位の塩基の解析、及び／又は 211 位の塩基の解析は、両アレルを対象とすることができる。

- 5 TA 反復配列数を解析する方法、686 位又は 211 位の塩基を解析する方法は特に限定されるものではなく、例えば、PCR(polymerase chain reaction)法を利用した PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism: 制限酵素断片長多型)法、PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism: 単鎖高次構造多型)法(Orita,M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 2766-2770(1989)等)、PCR-SSO(specific sequence oligonucleotide: 特異的配列オリゴヌクレオチド)法、PCR-SSO 法とドットハイブリダイゼーション法を組み合わせた ASO(allele specific oligonucleotide: アレル特異的オリゴヌクレオチド)ハイブリダイゼーション法(Saiki, Nature, 324, 163-166(1986)等)、又は TaqMan-PCR 法(Livak, KJ, Genet Anal, 14, 143(1999), Morris, T. et al., J. Clin. Microbiol., 34, 2933(1996))、Invader 法(Lyamichev V et al., Nat Biotechnol, 17, 292(1999))、プライマー伸長法を用いた MALDI-TOF/MS(matrix)法(Haff LA, Smirnov IP, Genome Res 7, 378(1997))、RCA(rolling circle amplification)法(Lizardi PM et al., Nat Genet 19, 225(1998))、DNA チップ又はマイクロアレイを用いた方法(Wang DG et al., Science 280, 1077(1998)等)、
- 15 プライマー伸長法、サザンブロットハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法(Southern, E., J. Mol. Biol. 98, 503-517(1975))等、公知の解析方法を用いることができる。さらに、当該配列部分を直接シーケンスすることにより解析してもよい。尚、これらの方法は、任意に組み合わせて用いることもできる。また、ステップ(a)ないし(c)の少なくとも二つを行い副作用発現
- 20 リスクの予測をする場合には、全てのステップにおいて同じ解析方法を用いるこ
- 25

とができることは勿論のこと、それぞれのステップにおいて任意の解析方法を選択して用いることができる。

被験 DNA が少量の場合には、PCR 法を利用した PCR-RFLP 法等により解析することが検出感度ないし精度の面から好ましい。また、PCR 法又は PCR 法に準じた遺伝子増幅方法により被検 DNA を予め増幅した後、上記いずれかの解析方法を適用することもできる。一方、多数の被験 DNA を解析する場合には、特に TaqMan-PCR 法、Invader 法、プライマー伸長法を用いた MALDI-TOF/MS(matrix)法、RCA(rolling circle amplification)法、又は DNA チップ又はマイクロアレイを用いた方法を用いることが好ましい。

10 UGT1A1 遺伝子は、被験者の血液、皮膚細胞、粘膜細胞、毛髪等から公知の抽出方法、精製方法を用いて取得することができる。また、本発明において解析される塩基部分を含むものであれば、全長 DNA 又は部分 DNA の別を問わず、本発明における UGT1A1 遺伝子として用いることができる。換言すれば、プロモータ領域の反復配列 (TA) の反復数を解析するステップにおいては、当該反復配列部分を含む限り任意の長さの DNA 断片を用いることができる。また、686 位の塩基を解析するステップにおいては、当該塩基部分を含む限り任意の長さの DNA 断片を用いることができる。同様に、211 位の塩基を解析するステップにおいては、当該塩基部分を含む限り任意の長さの DNA 断片を用いることができる。

また、UGT1A1 遺伝子の転写産物である mRNA を用いて、各ステップにおける解析を行うこともできる。この場合には、例えば UGT1A1 遺伝子の mRNA を被験者の血液等から抽出、精製した後、逆転写により cDNA を調製する。そして、当該 cDNA の塩基配列を解析することによりゲノム DNA の多型部分の配列を予測する。

さらに、エクソン 1 における二つの多型については、UGT1A1 遺伝子の発現産物を用いて解析することもできる。即ち、多型部分の発現産物 (アミノ酸) を分析することにより、エクソン 1 の遺伝子型を決定することができる。この場合、エ

- クソン 1 の当該多型部分に対応するアミノ酸を含んでいる限り、部分ペプチドであっても測定対象とすることができる。具体的には、エクソン 1 の 211 位における多型はコドン 71 を変化させるため（グリシン又はアルギニンを生ずる）、コドン 71 に対応するアミノ酸を少なくとも含むペプチドを測定対象として用いることができる。同様に、エクソン 1 の 686 位における多型はコドン 229 を変化させるため（プロリン又はグルタミンを生ずる）、コドン 229 に対応するアミノ酸を少なくとも含むペプチドを測定対象として用いることができる。尚、コドン 71 に対応するアミノ酸及びコドン 229 に対応するアミノ酸の両者を含むペプチドないしタンパクを用いれば、二つの多型を併せて解析することが可能である。
- 10 ペプチド又はタンパクを用いて多型部分に対応するアミノ酸を分析する方法としては、周知のアミノ酸配列分析法（エドマン法を利用した方法）を用いることができる。また、アミノ酸の変化により UGT1A1 遺伝子の発現産物の立体構造が変化することが予想されるため、免疫学的な手法によりアミノ酸の種類を分析することもできる。免疫学的な手法としては、例えば、E L I S A 法（酵素結合免疫
- 15 吸着定量法）、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降法、免疫拡散法等を挙げることができる。

- 「UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物」とは、生体に投与されたときに、生体内において UGT1A1 酵素によって直接代謝される化合物、又は一旦他の酵素等によって代謝され、その結果生ずる代謝産物（中間代謝物）が UGT1A1 酵素によって代謝される化合物をいう。かかる性質の化合物であれば特に限定されないが、例えば、カンプトテシン類似化合物が該当する。上記性質を有するカンプトテシン類似化合物であればその種類は特に限定されず、例えば、トポテカン、イリノテカン(CPT-11)等の公知のカンプトテシン誘導体が該当する。さらに、上記性質が維持されることを条件に、公知のカンプトテシン
- 20 類似化合物、公知のカンプトテシン誘導体（トポテカン、イリノテカン等）にお
- 25

いて一又は数個の置換基が他の原子又は原子団に置換された化合物であってもよい。

尚、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の好適な例としてはイリノテカンを挙げることができる。

- 5 副作用発現リスクとは、本発明における化合物を投与することに起因して副作用が生ずる危険性をいう。ここで、副作用とは、本発明における化合物を投与した場合に期待される効果（薬効）以外の作用・効果をいい、生体に悪影響を及ぼすものは勿論のこと、当該化合物本来の効果を減少させるものも含まれる。従って、本発明の方法では当該化合物投与の本来の効果を減少させる危険性も副作用
- 10 発現リスクに含まれる。

本発明の化合物がイリノテカンである場合の副作用の一例を示せば、白血球減少症又は下痢がある。これらの症状は、イリノテカンを投与された患者に対して、時として致死的な悪影響を及ぼす。

- 副作用の発現リスクを予測した結果は当該化合物の投与量を設定することに利用
- 15 できる。そこで、本発明の他の局面は、上記副作用発現リスクを予測する方法の結果に基づき前記化合物の投与量を設定するステップを含む、ことを特徴とする前記化合物の投与量設定方法である。かかる投与量設定方法によれば、当該化合物投与により生ずる副作用の程度と、当該化合物投与により期待される本来の効果の程度とを比較考量して、投与対象（患者）毎に適切な投与量の設定を行う
- 20 ことができる。従って、副作用の発生を抑えつつ、当該化合物による効果的な治療を行うことが可能となる。即ち、別の見方をすれば、当該化合物の副作用を低減するための方法が提供されることとなる。

- 本発明の他の局面は、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸（以下、「TA 反復数解析用核酸」という）、
- 25 UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸（以下、

「686 位解析用核酸」という)、及び UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸 (以下、「211 位解析用核酸」という) を提供する。

- TA 反復数解析用核酸としては、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の TA 反復領域の塩基を含み、かつ次の二組のプライマーセット (配列番号 7 と配列番号 8 の組、又は配列番号 9 と配列番号 10 の組) のいずれかを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸を挙げることができる。

順方向プライマー (配列番号 7)

5'-AAGTGAACCTCCCTGCTACCTT-3'

- 10 逆方向プライマー (配列番号 8)

5'-CCACTGGGATCAACAGTATCT-3'

順方向プライマー (配列番号 9)

5'-GTCACGTGACACAGTCAAAC-3'

逆方向プライマー (配列番号 10)

- 15 5'-TTTGCTCCTGCCAGAGGTT-3'

686 位解析用核酸としては、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含み、かつ次のプライマーセット (配列番号 3 及び配列番号 4) を用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸を挙げることができる。

- 20 順方向プライマー (配列番号 3)

5'-AGTACCTGTCTCTGCCAC-3'

逆方向プライマー (配列番号 4)

5'-GTCCCACTCCAATACACAC-3'

- 25 211 位解析用核酸としては、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を含み、かつ次のプライマーセット (配列番号 1 及び配列番号 2) を用いた PCR

法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸を挙げることができる。

順方向プライマー（配列番号 1）

5'-CTAGCACCTGACGCCTCGTTGTACATCAGAGCC-3'

5 逆方向プライマー（393 位～412 位）（配列番号 2）

5'-CCATGAGCTCCTTGTGTGC-3'

本発明の他の局面は、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸（TA 反復数解析用核酸）を含む、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスク予測用キットを提供する。

一方、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸（686 位解析用核酸）を含むことにより、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスク予測用キットを構成することができる。

15 また、TA 反復配列数解析用核酸に加えて、686 位解析用核酸を含むことにより、本発明のキットを構成することもできる。さらに、TA 反復配列数解析用核酸に加えて、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸（211 位解析用核酸）をさらに含むことにより、本発明のキットを構成することもできる。尚、各キットの使用方法に応じた一又は二以上の試薬を組み合わせ

20 上記各キットを構成してもよい。例えば、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の TA 反復配列数領域を含む DNA を増幅するための試薬、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基領域を含む DNA を増幅するための試薬、及び／又は UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基領域を含む DNA を増幅するための試薬を組み合わせキットを構成することができる。

25 以上の各核酸は、それぞれのキットにおいて利用される解析方法（上述した

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism: 制限酵素断片長多型) 法、PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism: 単鎖高次構造多型) 法 (Orita, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 2766-2770 (1989) 等) 等の解析方法) に用いられるものであって、例えば、プライマー、プローブである。プライマーの例としては、解析対象となる多型部位 (プロモータ領域、686 位の塩基、211 位の塩基) を含む領域を特異的に増幅させることができるプライマーが挙げられる。また、PCR-RFLP 法を実行するキットを構成する場合には、例えば、PCR 増幅産物を制限酵素処理した場合に遺伝子型が識別されるように、特定の多型を有する場合に当該多型部分において特定の制限酵素部位が形成されるように設計したプライマーが用いられる。また、TaqMan-PCR 法、Invader 法を実行するキットを構成する場合には、各方法に用いられるプライマー及び/又はプローブを核酸の例として挙げるができる。

プローブ、プライマーには、解析方法に応じて、適宜 DNA 断片又は RNA 断片が用いられる。プローブ、プライマーの塩基長は、それぞれの機能が発揮される長さであればよく、プライマーの塩基長の例としては 15~30bp 程度、好ましくは 20~25bp 程度である。

上記のように、本発明の方法を容易に実施するためには、これに適した遺伝子多型検出キットを用いることが好ましい。このようなキットは、上記の説明に基づき容易に設計することができるが、基本的に PCR 法等による被検 DNA の増幅を行わずにゲノム DNA でもアッセイが実施できる方法である Invader 法を例としてさらに説明する。

Invader 法によるキットを構成する場合には、2 種類の非蛍光標識オリゴヌクレオチド (1)、(2) と 1 種類の蛍光標識オリゴヌクレオチド (3) 並びに DNA の構造を認識して切断する特殊なエンドヌクレアーゼ活性を有する酵素 (4) を使用する。2 種類の非蛍光標識オリゴヌクレオチドをそれぞれ「アレルプローブ

(あるいはシグナルプローブ、レポータープローブ)」、「インベータープローブ」と呼び、蛍光標識オリゴヌクレオチドを「FRET プローブ」、DNA の構造を認識して切断する特殊なエンドヌクレアーゼ活性を有する酵素を「clevase」と呼ぶ。

(1) アレルプローブは、鋳型である UGT1A1 酵素をコードする遺伝子(以下、
5 略して「UGT1A1 遺伝子」ともいう)中の解析対象となる多型部位(以下、「多型部位」という)より 5'側に対して相補的となる塩基配列を有し、多型部位より一塩基 3'側に対して相補結合し得ない任意の塩基配列(フラップと呼ぶ)を有するように設計する。すなわちアレルプローブ自体から見た場合、5'末端よりフラップ部分・鋳型中の多型部位より 5'側に相補的な配列部分の順で構成されている。なお
10 フラップの配列は UGT1A1 遺伝子配列はもとより、アレルプローブあるいはインベータープローブ、さらには試料中の UGT1A1 遺伝子以外の DNA と相補結合をし得ない配列を使用する。

(2) インベータープローブは、鋳型である UGT1A1 遺伝子中の多型部位より 3'側に対して相補的に結合するように設計するが、多型部位にあたる配列は任意
15 の塩基 (N) でよい。すなわちインベータープローブ自体から見た場合、5'末端より鋳型の多型部位より 3'側に対して相補的な配列部分・3'末端に N の順で構成されている。

このように構成された (1)、(2) は本発明の「TA 反復数解析用核酸」、「686 位解析用核酸」あるいは「211 位解析用核酸」に相当する。(1)、(2) 2 種類の
20 プローブと UGT1A1 遺伝子を相補結合させると多型部位にインベータープローブの 1 塩基 (N) が浸入 (invasion) することができる。

(3) FRET (fluorescence resonance energy transfer) プローブ は、UGT1A1 遺伝子とは全く無関係な配列により構成することができ、検出したい多型部位によらず共通でよい。5'側には自分自身で相補結合できる配列を有し、3'側にはフ
25 ラップに対して相補的な配列を有している。また、5'末端には蛍光色素を標識し、

その上流には消光物質（クエンチャー）が結合されている。

（４）cleavase は、構造特異的フラップエンドヌクレアーゼ（FENs）に分類される DNA の構造を認識して切断する特殊なエンドヌクレアーゼ活性を有する酵素であり、鋳型 DNA、インベータープローブおよびアレルプローブの 3 つの塩基が並び、アレルプローブの 5'末端がフラップ状になっている部分を認識して、そのフラップ部分を切断する。

以上のような 3 種類のプローブ（１）～（３）と cleavase（４）を用いると模式的に以下のような二段階の反応が生じる。

まずアレルプローブ（１）が UGT1A1 遺伝子と相補結合したときに、多型部位にインベータープローブ（２）の 3'末端（N）が侵入する。この 3 塩基が並んだ多型部位の構造を cleavase（４）が認識してアレルプローブ（１）のフラップ部分を切断し、フラップ部分が遊離する。次に、アレルプローブ（１）から遊離したフラップ部分は、FRET プローブ（３）と相補的な配列をもつため FRET プローブ（３）と相補結合する。このときフラップ部分の 3'末端に存在する多型部位が FRET プローブ（３）自身の相補結合部位に侵入する。cleavase（４）は、今度はこの構造を認識して蛍光色素が結合している部位を切断する。これにより蛍光色素はクエンチャーと離れるため蛍光を発する。この蛍光強度を測定して多型を検出し、解析する。

（１）～（４）は例えば、（１）と（２）、（３）と（４）を組み合わせる 2 種類の試薬組成物として組み合わせる使用することや、（３）および（４）を事前に乾燥させてマイクロタイタープレートに封入しておくこともできる。これらによりアッセイのステップ数を減らすことができる。また（１）と（２）を含む試薬組成物にマグネシウム、緩衝剤等を適宜配合し、反応を最適化することもできる。さらに（１）～（４）以外に測定中の試料の蒸発を防止する鉱油などを組み合わせることもできる。

なお、アレルプローブ(1)について2種類のプローブを用意すれば、UGT1A1 遺伝子がホモ接合体であるかヘテロ接合体であるかを鑑別することもできる。

これらは、大西洋三,ポストシーケンスのゲノム科学「SNP 遺伝子多型の戦略」,94-135,中山書店,2000、Treble, M., et al., 遺伝子医学, 4: 68-72, 2000 の総
5 説や国際公開公報である WO97/27214、WO98/42873 に図解され、記載されているので、これらを参照して最適な設計をすることが可能である。

尚、本発明のキットにより UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクが予測できるため、その予測結果に基づいて投与対象毎に適切な当該化合物の投与量を設定できる。換言すれば、
10 本発明のキットは、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与量を設定するために用いることができる。

副作用発現リスクの少ないと判断される遺伝子多型(即ち、プロモータ領域の TA 反復配列数が 6、エクソン 1 の 211 位がグアニン(G)である、及び/又は、エクソン 1 の 686 位がシトシンである)を有する UGT1A1 遺伝子又は、当該いずれかの多型部位を少なくとも一つ含有する DNA 断片を、化合物の投与を受ける患者の細胞、特に、UGT1A1 酵素が当該化合物の代謝、解毒化に作用する部位における細胞に導入することにより、当該化合物の副作用の発現リスクを低減することができる。遺伝子の導入は、当該化合物の投与前、投与中、又は投与後に行うことができる。遺伝子の導入は、例えば、遺伝子導入用プラスミド又はウイルスベクターを用いた方法、エレクトロポレーション(Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 34, 7413-7417(1984))、マイクロインジェクション(Graessmann, M. & Graessmann, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 366-370(1976))等の方法により行うことができる。
15
20

25 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。本実施例では、イリノテ

カン投与による副作用と UGT1A1 遺伝子の多型との相関を統計学的に解析した。

[患者情報及び臨床情報]

1994 年 7 月から 1999 年 6 月にイリノテカンを含む化学療法を受けている日本人患者を対象とした。患者の安全を確保するために、イリノテカン使用前に骨髓機能の問題ないこと(白血球 $3 \times 10^9/l$ 以上、血小板 $100 \times 10^9/l$ 以上)を確認した。さらに、水溶性下痢、麻痺性イレウス、間質性肺炎や肺線維症、広範囲にわたる重症の腹水や胸水、明らかな黄疸、イリノテカンに過敏症の既往歴がある患者を除外した。この結果、118 名の患者を本実施例の対象とした。

イリノテカンの適応性を確認するため、週に一回は全血、血小板数および血清化学値について測定を行った。また、ビリルビン値は常に測定することとした。

患者情報(年齢、性別等)を含む臨床記録、並びにイリノテカン投与量及び投与スケジュール、他の薬や放射線療法の記録、イリノテカンによる副作用等について、レトロスペクティブに調査を行った。顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)やイリノテカン誘導性の下痢に対して日本において一般的に処方されている塩酸ロペラミドの投与日を数えた。G-CSF の予防投与により、好中球減少症がはっきりと発症することはなかった。イリノテカンの量規定因子(dose limiting toxicity)により、白血球減少症と下痢を引き起こすことが知られていることから、グレード 4 の白血球減少($<0.9 \times 10^9/l$)、グレード 3 又はそれ以上悪化した下痢(グレード 3 は 5 日以上続く下痢、グレード 4 は出血または脱水症状を伴う、各グレードは日本がん治療学会の基準に準ずる)を、severe toxicity(重篤副作用)と定義した。他の副作用は種々の患者背景に影響されることから、本実施例において分析対象としなかった。血清全ビリルビン値は、イリノテカン投与直前及び治療後の最高値について記録した。

[遺伝子型の分析]

各患者(118 名)より血液サンプルを採取し、各サンプルについて遺伝子型

の分析を行った。まず、100~200 μ lの全血から QIAamp Blood Kit(QIAGEN GmbH,Hilden,Germany)を用いてゲノム DNA を調製した。尚、操作方法は当該キットに添付された説明書に従った。

各ゲノム DNA について、次の変異配列を解析した(図1を参照)。即ち UGT1A1
5 遺伝子における、TATA ボックス内の2塩基ペアー (TA) の挿入(この結果、
39 位~53 位に (TA)₇TAA を生ずる。このタイプを UGT1A1*28 と称する
(Monaghan, G., Ryan, M., Seddon, R., Hume, R., and Burchell, B., Lancet,
347: 578-581, 1996, Bosma, P. J. et al., N. Engl. J. Med., 333: 1171-1175, 1995)、
エクソン1のコードン71における置換(転写開始点の下流211位のグアニン(G)
10 をアデニン(A)に置換する。当該置換はグリシンをアルギニンに変化させる(当該
変異を G71R と表す。このタイプを UGT1A1*6 と称する。)、エクソン1のコード
ン229におけるプロリンをグルタミンに換える置換(P229Qと表す。このタイ
プを UGT1A1*27 と称する。)、エクソン4のコードン367における置換(1099
位における置換。シトシン(C)からグアニン(G)への置換。当該置換はアルギニン
15 をグリシンに置換する。R367Gと表す。このタイプを UGT1A1*29 と称する。)、
及びエクソン5のコードン486における置換(1456位における置換。チミン(T)
からグアニン(G)への置換。当該置換はチロシン(Y)をアスパラギン酸(D)に置換す
る。Y486Dと表す。このタイプを UGT1A1*7 と称する。)(Monaghan, G., Ryan,
M., Seddon, R., Hume, R., and Burchell, B., Lancet, 347: 578-581, 1996,
20 Bosma, P. J. et al., N. Engl. J. Med., 333: 1171-1175, 1995, Aono, S. et al.,
Lancet, 345: 958-959, 1995, Aono, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.,
197: 1239-1244, 1993)。

UGT1A1*28は、先に報告されたPCR増幅反応を用いた方法(Monaghan, G. et
al., Lancet, 347: 578-581, 1996, Ando, Y. et al., Pharmacogenetics, 8: 357-360,
25 1998に記載される方法)により得られる253-255塩基対の配列を直接決定する

ことにより、最も一般的なアレル (UGT1A1*1) と識別された。

塩基配列の解析は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いたダイ・ターミ
ネタ・シーケンス反応を利用したサイクルシーケンシング法により行った
(ABI Prism DNA Sequencing Kit, Perkin-Elmer, Foster City, CA)。

- 5 その他の変異遺伝子型 (UGT1A1*6 等) は PCR-RFLP 法により UGT1A1*1 と
識別された。エクソン 1 の分析のために、エクソン 1 を含む 923 塩基対の断片を
先に報告された方法 (Akaba, K. et al., Biochem. Mol. Biol. Int., 46: 21-26,
1998) に従って第 1 段階 PCR により増幅した。

- 続いて、UGT1A1*6 の分析のために、235 塩基対の断片を増幅するように設計
10 された入れ子 (nested) プライマーを用いて第 2 段階 PCR による増幅反応を行
った。ミスマッチ配列を含む順方向プライマーと逆方向プライマーは 次のお
りである。

順方向プライマー (178 位～210 位) (配列番号 1)

5'-CTAGCACCTGACGCCTCGTTGTACATCAGAGCC-3'

- 15 逆方向プライマー (393 位～412 位) (配列番号 2)

5'-CCATGAGCTCCTTGTGTGC-3'

- 下線部はミスマッチ部位である。UGT1A1*1 では MspI (タカラ酒造 株式会
社、大津市、日本) 制限酵素サイトが導入され、UGT1A1*6 では導入されないよ
うに順方向プライマーは設計されている。第 1 段階 PCR 反応による増幅産物を
20 1000 倍に希釈し、入れ子プライマーを用いた PCR (nested PCR、第 2 段階 PCR)
に供した。その際、サンプル 50 μ l 中に、0.2mM の各デオキシヌクレオチド三リン
酸、50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH8.3)、1.5mM MgCl₂、各プライマー
0.5 μ M、及び Taq ポリメラーゼ 1.3 ユニット (宝酒造 株式会社、大津市、日本)
を含有させた。PCR の条件は次のとおりである。95℃、5min の反応、及びこれ
25 に続いて行われる 25 サイクルの反応 (94℃、30s、60℃、40s、及び 72℃、40s)

である (PCR Thermal Cycler MP, 宝酒造 株式会社、大津市、日本)。1 μ l の PCR 増幅産物を 4units の MspI で 37℃、1 h 処理した。UGT1A1*1 由来の DNA は 203 塩基対と 32 塩基対の断片に消化され、UGT1A1*6 からは消化されなかった 235 塩基対の断片が生じ、ヘテロ接合 DNA からは上記 3 断片の全てが生じた。

- 5 UGT1A1*27 の塩基配列を決定には、399 塩基対の断片を増幅するために設計された以下のプライマー (片方を入れ子プライマー (nested primer) としてある) を用いた第 2 段階 PCR を行った。

順方向プライマー (485 位～503 位) (配列番号 3)

5'-AGTACCTGTCTCTGCCCAC-3'

- 10 逆方向プライマー (865 位～867 位及びイントロン 1) (配列番号 4)

5'-GTCCCACTCCAATACACAC-3'

- UGT1A1*27 には二つの BsrI (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 制限酵素サイトが存在し (552 位～556 位、及び 684 位～688 位)、一方、UGT1A1*1 にはかかる制限酵素サイトが一つ存在する (552 位～556 位)。一連の PCR 増幅反応は上記の MspI RFLP の場合と同一の条件で行った。PCR 増幅産物を、
15 2.5unit の BsrI により、65℃、1h の条件で消化した。その結果、UGT1A1*27 からは 199 塩基対、132 塩基対、及び 68 塩基対の断片が生じ、UGT1A1*1 からは 331 塩基対及び 68 塩基対の断片が生じた。尚、ヘテロ接合型の DNA からは上記 4 断片の全てが生じた。

- 20 同様に、UGT1A1*29 の塩基配列を、入れ子プライマーを用いた PCR-RFLP 法により解析した。エクソン 2、3、及び 4 を包含する第 1 段階 PCR 増幅反応を、先に報告されている方法 (Akaba, K. et al., Biochem. Mol. Biol. Int., 46: 21-26, 1998) に多少の改良を加えた方法に従って行った。即ち、第 2 段階 PCR 増幅反応には、285 塩基対の断片を増幅するために設計された、ミスマッチ配列を含む
25 順方向プライマー及び逆方向プライマーを用いた。

順方向プライマー（イントロン 3、及び 1085 位～1098 位、下線部はミスマッチ部位を示す）（配列番号 5）

5'-TCCTCCCTATTTTGCATCTCAGGTCACCCGATGGCC-3'

逆方向プライマー（イントロン 4）（配列番号 6）

5 5'-TGAATGCCATGACCAAA-3'

順方向プライマーは、UGT1A1*1 から Cfr13I（宝酒造 株式会社、大津市、日本）制限酵素サイト（1095 位～1099 位）を生じ、UGT1A1*29 からはかかる制限酵素サイトが生じないように設計してある。尚、PCR 反応試薬混合物は、上記 UGT1A1*6 における第 2 段階 PCR 反応の場合と同一のものを使用した。PCR
10 増幅産物を Cfr13I 酵素により消化した。UGT1A1*1 由来の DNA は 252 塩基対及び 33 塩基対の断片に消化され、UGT1A1*29 由来の DNA からは消化されなかった 285 塩基対の断片を生じた。

UGT1A1*7 の検出のために、先に報告されたプライマー（Akaba, K., et al., Biochem. Mol. Biol. Int., 46: 21-26, 1998）を用いて、エクソン 5 の 579 塩基対
15 の断片を PCR 法により増幅した。

尚、PCR 反応試薬混合物は、上記 UGT1A1*6 における第 2 段階 PCR 反応の場合と同一のものを使用した。UGT1A1*1 の配列には BsrI 制限酵素サイト（1452 位～1456 位）が存在し、一方、UGT1A1*7 には当該制限酵素サイトは存在しない。従って、BsrI 酵素を加えてインキュベーションすることにより、UGT1A1*1
20 は 365 塩基対及び 214 塩基対の断片に消化され、一方、UGT1A1*7 由来 DNA からは消化されなかった 579 塩基対の断片が生じた。

上記の操作の結果得られた各制限酵素断片を、4%アガロースゲルを用いた電気泳動及びエチジウムブロマイド染色により分析した。以上全ての変異についての遺伝子型解析の結果は、直接的シーケンス分析により確認した。

25 以上の操作により、患者毎に UGT1A1 遺伝子の型を決定した。

【統計的解析】

イリノテカンの重篤副作用と UGT1A1 遺伝子の型（遺伝子多型）との相関関係の解析及び評価は、以下の統計的手法によって行った。

- 候補ファクターとして、性別、年齢、一般状態(Performance Status:PS)、主要
- 5 疾患、遠隔転移の存在、治療履歴、糖尿病と肝臓疾患との併発、化学療法レジメ、同時に行われる放射線療法、及びイリノテカン点滴の投与スケジュール及び一回あたりの投与量を用いた。化学療法レジメについては、3つのグループに分けた。即ち、イリノテカンのみを投与したグループ、イリノテカン及びプラチナ製剤（シスプラチン又はカルボプラチン）を投与したグループ、イリノテカン
- 10 及び他の薬剤（パクリタセル(paclitaxel)、ドセタセル(docetaxel)、エトポシド(etoposide)、ミトマイシン C(mitomycin C)、又は5-フルオトウラシル(5-fluorouracil))を投与したグループである。位置変数間の相関性（関連性）は、絶対変数に対しての χ^2 （カイ二乗）テスト又は Fisher's exact test、又は連続変数に対しての Mann-Whitney U test を用いて評価した。重篤副作用（ $p < 0.1$ ）と相関があると予想される候補変数は非限定マルティプルロジスティック回帰分析(unconditional multiple logistic regression analysis)において取り込むこととした。顆粒球コロニー刺激因子及びロペラミド塩酸塩の全実質的投与量及び使用については、化学療法の結果に強く依存するものと考えられるため、多変量解析において考慮しなかった。最終的な統計モデルにおける変数は、ステップワイズ法を用いて有意水準 0.25 (forward) および 0.1 (backward) において選択した。重篤副作用の発現に対する遺伝子多型の重要性は、その他の要因を補正に加えることにより検討した。
- 15
- 20

- 上記の解析は、JMP ver.3.0.2 ソフトウェア（SAS Institute Inc., Cary, NC）を用いて行った。両側検定値（ P 値）が 0.05 より小さい場合に統計的に有意な相
- 25 違とした。

【イリノテカンの副作用と臨床情報】

1 1 8名の患者についての臨床情報を検討した結果、9名(8%)がグレード
4の白血球減少症($\leq 0.9 \times 10^9/\text{liter}$)を経験しており、38名(32%)がグレー
ド3の白血球減少症($1.9-1.0 \times 10^9/\text{liter}$)を経験していた。一方、3名(3%)が
5 グレード4(出血性又は脱水症)の下痢を経験しており、19名(16%)がグ
レード3(5日以上の間、水状)の下痢を経験していた。グレード4の白血球減少
症を経験した患者9名の内、5名はグレード3又は4の下痢も経験していた。ま
た、グレード3又は4の下痢を経験した患者22名の内、16名はグレード3又
は4の白血球減少症も経験していた。以上の臨床情報を基に、重篤副作用を経験
10 した患者(以下、「副作用経験者」という)26名と経験していない患者(以下、「副
作用非経験者」という)92名とに区分けし、臨床情報及びイリノテカン化学療法
の情報を、図2の表及び図3の表にそれぞれまとめた。副作用経験者では、イリ
ノテカンの実質的全投与量がより少なく、顆粒球コロニー刺激因子又はロペラミ
ド(loperamide)塩酸塩をより多く投与したことが分る。

15 【遺伝子型の分布】

1 1 8名全ての患者について、上記の方法によりその遺伝子型を決定し、図4
にまとめた。尚、UGT1A1*29又はUGT1A1*7を有する患者はいなかった。また、
9名については既に報告された結果(UCT1A1*28)を用いた(Ando, Y., Saka, H.,
Asai, G., Sugiura, S., Shimokata, K., and Kamataki, T., Ann. Oncol., 9:
20 845-847, 1998.)。また、117名の患者に関して、化学療法前の全ビリルビンレ
ベル、及び化学療法期間における全ビリルビンレベルの最大値を測定し、その結
果を図4の表に併せて記載した。

図4の表に示されるように、5名の遺伝子型において、同時に二つの多型が認
められた。即ち、2名(矢印Aで示される)は、ヘテロ接合のUGT1A1*28及び
25 ヘテロ接合のUGT1A1*6を有していた。また、3名は、ヘテロ接合のUGT1A1*27

を有し、同時にホモ接合（2名：矢印 C で示される）又はヘテロ接合（1名：矢印 B で示される）の UGT1A1*28 を有していた。

ともにヘテロ接合の UGT1A1*28 及び UGT1A1*6 を有する 2 名（矢印 A で示される）は正常範囲のビリルビンレベルであった（化学療法前は、それぞれ 13.9
5 $\mu\text{mol/liter}$ と 15.4 $\mu\text{mol/liter}$ 、化学療法開始後は、それぞれ 10.3 $\mu\text{mol/liter}$ と 15.4 $\mu\text{mol/liter}$ ）。これらの 2 名を除いて、遺伝型間のビリルビンレベルの相違は、化学療法前（ $p=0.031$, Kruskal-Wallis test）及び化学療法開始後（ $p<0.001$ 、）ともに、統計的に有意であった。

UGT1A1*28 アレルの出現頻度は、副作用経験者と副作用非経験患者について、
10 それぞれ 0.308（95% CI, 0.004~0.149）と 0.087（95% CI, 0.046~0.128）であり、UGT1A1*6 アレルの出現頻度については、同様に 0.077（95% CI, 0.004~0.149）と 0.136（95% CI, 0.086~0.185）であった。

副作用経験者と副作用非経験者間のアレル分布における相違は、UGT1A1*28 に関しては統計的に有意（ $p<0.001$ ）であったが、UGT1A1*6 に関しては有意と
15 認められなかった（ $p>0.2$, GENEPOP ver.3.1d ソフトウェア、the Laboratoire de Genetique et Environnement, Montpellier, France）。

[遺伝子型と副作用との相関]

ロジスティック回帰分析（logistic regression analysis）を行ったところ、ヘテロ接合又はホモ接合の UGT1A1*28 を有する遺伝子型が、重篤副作用の有効な
20 指標になることが示された（見込み確率, 5.21; 95% CI, 1.98~13.96; $p<0.001$ 、図 4 を参照）。他方、UGT1A1*6 と重篤副作用との統計的相関は見られなかった（見込み確率, 0.55; 95% CI, 0.15~1.61; $p>0.2$ ）。

次に、重篤副作用に影響を与える他の因子と遺伝子型の変異との比較を行った。図 2 の表及び図 3 の表に示されるように、性別、化学療法レジюме、イリノテカ
25 ン点滴スケジュールが高い毒性に関連する。そこで、これらのファクターについ

て相関性を調べた。その結果、化学療法レジюмеとイリノテカン点滴スケジュールとの間に有意な相関 ($p < 0.001$, χ^2 テスト) がみられた。即ち、3 又は 4 週サイクルのイリノテカン治療を受けた 19 名の内 12 名 (63%) が、その他の抗癌剤の投与を受けていた。化学療法レジюмеはイリノテカンの高い毒性と強い相

5 関を有する変数と考えられたため、これを統計モデルに取り込んだ。

一方、化学療法レジюме、性別、及び UGT1A1*28 遺伝子型の間には有意な相関が見られなかった。また、UGT1A1*28 の他に、女性であること、及び他の抗癌剤 (プラチナ製剤を除く) を使用すること、が重篤副作用に重要な因子であることがわかった。これらの二つの因子と UGT1A1*28 との比較を図 5 の表に示し

10 た。図 5 の表に示されるように、UGT1A1*28 を有することにより、イリノテカンによる重篤副作用が 7 倍にも増加する。また、女性であることとイリノテカンの重篤副作用との間には有意なレベルの相関性は認められなかった。以上の知見より、UGT1A1*28 が重篤副作用に対する指標として非常に有効であることがわかる。

15 一方、グレード 4 の白血球減少症及びグレード 3 以上の下痢を併発した 5 名の患者の内 2 名は UGT1A1*28 及び UGT1A1*27 を、他の 2 名はヘテロ接合の UGT1A1*6 を、残りの一名はホモ接合の UGT1A1*1 を (即ち、変異した遺伝型を有していない) それぞれ有していた。一方、5 名の内 4 名 (80%) がプロモータ領域 (UGT1A1*28) 及びエクソン 1 (UGT1A1*6 又は UGT1A1*27) の両方

20 に変異した配列を有しており、これらの患者は生命に危険なレベルの毒性を受けていた。以上の結果から、UGT1A1*28 に注目すれば、UGT1A1*28 を有することにより、高い確率でイリノテカンの重篤副作用が生ずることが示唆される。従って、プロモータ領域の変異 (TA 反復配列の違い) を解析することによりイリノテカンの副作用発現リスクを予測可能であるといえる。また、UGT1A1*28 と

25 UGT1A1*6 又は UGT1A1*27 のいずれかを併せて有することにより、高い確率で

イリノテカンの重篤副作用が生ずることが示唆される。従って、プロモータ領域の変異とエクソン 1 における変異とを併せて解析することにより、イリノテカンの副作用発現リスクを予測可能であるといえる。

- さらに、ホモ接合の UGT1A1*6 を有する 2 名（図 4 の表、矢印 D で示される）
- 5 は、重篤副作用を経験しておらず、また、ヘテロ接合の UGT1A1*27 を有する 3 名（同表、矢印 B 及び矢印 C で示される）はいずれも重篤副作用を経験していることがわかる。このことから、UGT1A1*27 を有することにより、高い確率でイリノテカンの重篤副作用が生ずることが示唆される。従って、UGT1A1*27 の存在、即ち、コドン 229 における多型を解析することにより、イリノテカンの副作用
- 10 発現リスクを予測可能であるといえる。

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

15 産業上の利用の可能性

- 本発明の方法によれば、イリノテカン我代表とする、それ自体又は中間代謝物が UGT1A1 酵素に代謝される化合物の投与による副作用のリスクを事前に予測することができる。その結果、患者毎に副作用のリスクを考慮した化合物（薬剤）の投与が可能となり、副作用の低減が可能となる。特に、イリノテカンの投与に
- 20 よる白血球減少症、下痢といった副作用の発現リスクを事前に予測することができ、当該副作用のリスクを軽減することができる。

- また、日本人の 20% 以上が UGT1A1 に変異を有しており、そのためイリノテカンの高い毒性に対して高いリスクを有し得ると考えられるため、UGT1A1 の遺伝型を分析することにより、特に日本人患者におけるイリノテカンの副作用を軽減
- 25 減することができるといえる。

請 求 の 範 囲

1. UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法であって、少なくとも(a): UGT1A1 酵素を
5 コードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するステップを含む方法。

10

2. TA 反復配列数を解析するステップが、TA 反復配列数が 5 ないし 8 のいずれかであることを解析するステップである、請求の範囲第 1 項に記載の方法。

3. TA 反復配列数を解析するステップが、TA 反復配列数が 6 または 7 であることを解析するステップである、請求の範囲第 1 項に記載の方法。

4. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列領
15 域を含む DNA を増幅するステップをさらに含む、請求の範囲第 1 項ないし第 3 項のいずれか 1 項に記載の方法。

5. UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法であって、(b): UGT1A1 酵素をコードする
20 遺伝子の 686 位の塩基を解析するステップ、及び／又は、(c): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するステップをさらに含む、請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれか 1 項に記載の方法。

6. 686 位の塩基を解析するステップが、686 位の塩基がシトシンであるかまたは
25 はアデニンであるかを解析するステップである、請求の範囲第 5 項に記載の方法。

7. 211 位の塩基を解析するステップが、211 位の塩基がグアニンであるかまたはアデニンであるかを解析するステップである、請求の範囲第 5 項に記載の方法。
- 5 8. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含む DNA、及び／又は UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を含む DNA、を増幅するステップをさらに含む、請求の範囲第 5 項ないし第 7 項のいずれか 1 項に記載の方法。
9. UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法であって、少なくとも(b): UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するステップを含む方法。
- 10 10. 686 位の塩基を解析するステップが、686 位の塩基がシトシンであるかまたはアデニンであるかを解析するステップである、請求の範囲第 9 項に記載の方法。
- 15 11. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含む DNA を増幅するステップをさらに含む、請求の範囲第 9 項又は第 10 項に記載の方法。
- 20 12. 前記化合物は、カンプトテシン類似化合物である、ことを特徴とする請求の範囲第 1 項ないし第 11 項のいずれか 1 項に記載の方法。
13. 前記カンプトテシン類似化合物はカンプトテシン誘導体である、ことを特徴とする請求の範囲第 12 項に記載の方法。

14. 前記カンプトテシン誘導体は、トポテカン又はイリノテカンである、ことを特徴とする請求の範囲第13項に記載の方法。

15. 前記カンプトテシン誘導体は、イリノテカンである、ことを特徴とする請求の範囲第13項に記載の方法。

16. 請求の範囲第1項ないし第15項のいずれか一項に記載の副作用発現リスクを予測する方法の結果に基づき前記化合物の投与量を設定するステップを含む、ことを特徴とする前記化合物の投与量設定方法。

10

17. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸であって、

UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の TA 反復領域の塩基を含み、かつ配列番号7及び配列番号8のプライマーを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

15

18. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸であって、

UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の TA 反復領域の塩基を含み、かつ配列番号9及び配列番号10のプライマーを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

20

19. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸であって、

25 UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を含み、かつ配列番号1及び

配列番号 2 のプライマーを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

20. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸で
5 あって、

UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含み、かつ配列番号 3 及び配列番号 4 のプライマーを用いた PCR 法によって増幅され得る領域に由来する DNA 断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

- 10 21. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸を含む、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスク予測用キット。

22. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸、
15 及び／又は、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸をさらに含む、請求の範囲第 21 項に記載のキット。

23. UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸を含む、UGT1A1 酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与
20 による副作用発現リスク予測用キット。

24. 前記化合物は、カンプトテシン類似化合物である、ことを特徴とする請求の範囲第 21 項ないし第 23 項のいずれか 1 項に記載のキット。

- 25 25. 前記カンプトテシン類似化合物はカンプトテシン誘導体である、ことを特

徴とする請求の範囲第 2 4 項に記載のキット。

2 6 . 前記カンプトテシン誘導体は、トポテカン又はイリノテカンである、ことを特徴とする請求の範囲第 2 5 項に記載のキット。

5

2 7 . 前記カンプトテシン誘導体は、イリノテカンである、ことを特徴とする請求の範囲第 2 5 項に記載のキット。

2 8 . イリノテカンの副作用発現リスク予測用キットであって、少なくとも(a) :
10 UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解析するための核酸、(b) : UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸、のいずれか 1 以上を含む、キット。

2 9 . イリノテカンの副作用発現リスク予測用キットであって、UGT1A1 酵素を
15 コードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸、をさらに含む、請求の範囲第 2 8 項に記載のキット。

3 0 . イリノテカンの副作用発現リスク予測用キットであって、少なくとも(a) :
UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列数を解
20 析するための核酸、(b) : UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を解析するための核酸、のいずれか 1 以上を含み、さらに解析対象となる UGT1A1 酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域における TA 反復配列領域を含む DNA、あるいは UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 686 位の塩基を含む DNA を増幅するための試薬を含む、キット。

25

31. イリノテカンの副作用発現リスク予測用キットであって、UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を解析するための核酸及び UGT1A1 酵素をコードする遺伝子の 211 位の塩基を含む DNA を増幅するための試薬をさらに含む、請求の範囲第 30 項に記載のキット。

1/5

F i g. 1

アレル	ヌクレチオド変異	タンパクへの影響	エクソン
UGT1A1*28	(TA) _n TAA	発現減少	プロモーター
UGT1A1*6	211G→A	G71R	1
UGT1A1*27	686C→A	P229Q	1
UGT1A1*29	1099C→G	R367G	4
UGT1A1*7	1456T→G	Y486D	5

Fig. 2

白血球減少症 (グレード 4) 及び / 又は 下痢 (グレード 3 以上) ^a			
	経験者 (N = 26)	非経験者 (N = 92)	P
性別 (男性 / 女性)	14 / 12	66 / 26	0.085 ^b
平均年齢 (年齢範囲)	60 (38-76)	61 (41-75)	>0.2 ^c
一般状態 (performance Status)			>0.2 ^b
0	8 (31%)	31 (34%)	
1	15 (58%)	51 (55%)	
≥2	3 (12%)	10 (11%)	
原疾患			>0.2 ^b
小細胞肺癌	4 (15%)	17 (18%)	
非小細胞肺癌	16 (62%)	49 (53%)	
大腸癌	3 (12%)	18 (20%)	
その他	3 (12%)	8 (9%)	
遠隔転移	21 (81%)	68 (74%)	>0.2 ^b
前治療			>0.2 ^b
なし	12 (46%)	36 (39%)	
全身化学療法	12 (46%)	47 (51%)	
手術	8 (31%)	34 (37%)	
放射線治療	3 (12%)	17 (18%)	
合併症			>0.2 ^b
糖尿病	2 (8%)	8 (9%)	
肝疾患	3 (12%)	6 (7%)	

Fig. 3

白血球減少症 (グレード 4) 及び / 又は 下痢 (グレード 3 以上) ^a			
	経験者 (N = 26)	非経験者 (N = 92)	P
レジューメ			0.015 ^b
イリナカンのみ	3 (12%)	32 (35%)	
イリナカンとフルオウ製剤	13 (50%)	45 (49%)	
イリナカンと他の抗癌剤	10 (38%)	15 (16%)	
放射線治療の併用	1 (4%)	8 (9%)	>0.2 ^c
投与スケジュール			0.059 ^b
週 1 回 (days 1, 8 and 15)	15 (72%)	62 (67%)	
3、4 週間ごとに 1 回	8 (31%)	11 (12%)	
4 週間ごとに 2 回	3 (12%)	19 (21%)	
1 回あたりのイリナカン投与量			>0.2 ^b
<60	9 (35%)	18 (20%)	
60	8 (31%)	34 (37%)	
>60	9 (35%)	40 (43%)	
全実質的投与量 (mg/m ²)			0.010 ^b
<300	15 (58%)	24 (26%)	
301-600	7 (27%)	46 (50%)	
>600	4 (15%)	22 (24%)	
顆粒球コロニ-刺激因子の使用 (日)			<0.001 ^b
0	5 (19%)	61 (66%)	
1-14	11 (42%)	13 (14%)	
≥15	10 (38%)	18 (26%)	
ロペラミド塩酸塩の使用 (日)			0.002 ^b
0	4 (15%)	51 (55%)	
1-7	15 (58%)	28 (30%)	
≥8	7 (27%)	13 (14%)	
効果			>0.2 ^b
著効又は有効	11 (48%)	31 (39%)	
不変	8 (35%)	36 (45%)	
進行	4 (17%)	13 (16%)	
測定不可	3	12	

Fig. 4

遺伝子型			白血球減少症 (グレード 4) 及び / 又は下痢 (グレード 3 以上) ^a	
TATAボックス	コドン 71	コドン 229	経験者 (N = 26)	非経験者 (N = 92)
UGT1A1*28	UGT1A1*6	UGT1A1*27		
6 / 6			14 (54%)	79 (86%)
6 / 6	Gly / Gly	Pro / Pro	11	57
6 / 6	Gly / Arg	Pro / Pro	3	20
6 / 6	Arg / Arg	Pro / Pro	0	2 ← D
6 / 7			8 (31%)	10 (11%)
6 / 7	Gly / Gly	Pro / Pro	6	9
6 / 7	Gly / Arg	Pro / Pro	1 ← A	1 ← A
6 / 7	Gly / Gly	Pro / Gln	1 ← B	0
7 / 7			4 (15%)	3 (3%)
7 / 7	Gly / Gly	Pro / Pro	2	3
7 / 7	Gly / Gly	Pro / Gln	2 ← C	0
全ビリルビンレベル(μmol/liter) ^b				
治療前			8.6 (6.8-13.7)	8.6 (6.8-12.0)
投与後の最高値			16.2 (11.8-26.5)	13.7 (10.3-18.8)

5/5

Fig. 5

Term	β^a	SE	χ^2	P	Odds ratio (95% CI)
Intercept	0.763	0.591			
UGT1A1*28	1.979	0.550	12.95	0.0003	7.23 (2.52-22.3)
投与薬剤の組合せ ^b	1.510	0.557	7.36	0.0067	4.52 (1.53-13.9)
女性	0.849	0.508	3.10	0.0782	2.45 (0.90-6.75)

SEQUENCE LISTING

<110> Nagoya Industrial Science Research Institute
Hasegawa, Yoshinori
Ando, Yuichi
Shimokata, Kaoru

<120> Method for predicting severe toxicity caused by dosing
either a compound that is metabolized by UGT1A1 enzyme
or a compound whose metabolite is metabolized by the
enzyme.

<130> C0000101

<140>

<141>

<150> JP P2000-376756

<151> 2000-12-12

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer for
amplifying a 235-bp segment to analyze UGT1A1*6

<400> 1

ctagcacctg acgcctcgtt gtacatcaga gcc

33

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer for
amplifying a 235-bp segment to analyze UGT1A1*6

2/4

<400> 2
ccaatgagctc cttgttgtgc 20

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for
amplifying a 399-bp segment to analyze UGT1A1*27

<400> 3
agtacctgtc tctgcccac 19

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for
amplifying a 399-bp segment to analyze UGT1A1*27

<400> 4
gtcccactcc aatacacac 19

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for
amplifying a 285-bp to analyze UGT1A1*29

<400> 5
tcctccctat tttgcatctc aggtcacccg atggcc 36

<210> 6

3/4

<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for
amplifying a 285-bp to analyze UGT1A1*29

<400> 6
tgaatgccat gaccaa 17

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer for
analyzing TATA box region

<400> 7
aagtgaactc cctgctacct t 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer for
analyzing TATA box region

<400> 8
ccactgggat caacagtatc t 21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer for

4/4

analyzing TATA box region

<400> 9

gtcacgtgac acagtcaaac

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer for
analyzing TATA box region

<400> 10

tttgctcctg ccagaggtt

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10813

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/09, A61K31/4745, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/09, A61K31/4745, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Iyer L. et al., Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism, Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1999, Vol.65, No.5, pages 576 to 582	1-4, 12-18, <u>21, 24-27</u>
Y		5-11, 19, 20 22, 23, 28-31
X	Ando Y. et al., UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, Annals of Oncology, 1998, Vol.9, No.8, pages 845 to 847	1-4, 12-18, <u>21, 24-27</u>
Y		5-11, 19, 20, 22, 23, 28-31
Y	Aono S. et al., Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronyltransferase in Gilbert's syndrome, The Lancet, 1995, Vol.345, pages 958 to 959	5-16, 19, 20, <u>22-31</u>
A		1-4, 17, 18, 21
PX	Ando Y. et al., Polymorphisms of UDP-Glucuronosyl transferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis, Cancer Research, 2000.12.15, Vol.60, pages 6921 to 6926	1-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February, 2002 (28.02.02)

Date of mailing of the international search report

12 March, 2002 (12.03.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10813

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Maruo Y. et al., Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene, Pediatrics, 2000 Nov., Vol.106, No.5, e59	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10813

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet)

Requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1) in the international application is not fulfilled unless there is a technical relationship in a group of claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. This "special technical feature" is defined as a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2).

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. II of Continuation of first sheet (1)

First, discussion will be made on the inventions as set forth respectively in claims 1 and 5. The matter common to these inventions resides in "a method of estimating a risk of the expression of a side effect caused by the administration of a compound which is metabolized, either per se or as its metabolic intermediate, by UGT1A1 enzyme, which involves (a) the step of analyzing the TA repetitive sequence numbers in the promoter domain of a gene encoding the UGT1A1 enzyme". On the other hand, a prior document presented the analytical data on the relationship between the TA repetitive sequence numbers in the promoter domain of the gene encoding the UGT1A1 enzyme and the activity of the UGT1A1 enzyme of converting SN-38 (i.e., one of metabolic intermediates of irinotecan metabolized by the UGT1A1 enzyme) into glucuronide. Moreover, there is suggested a possibility that a treatment with the use of irinotecan could be optimized by analyzing the TA repetitive sequence numbers.

As stated by the applicant, it is true that the optimization of the treatment is merely "suggested" in the prior document. However, this suggestion was made based on the clear indication that an increase in the TA repetitive sequence number significantly related to a lowering in the conversion of SN-38 into glucuronide. Since such studies are made in order to reduce the expression risk of a side effect of a drug on an individual level, it can be concluded that the method for estimating the risk of the expression of the side effect caused by the administration of a compound metabolized, either per se or as its metabolic intermediate, by the UGT1A1 enzyme with the use of the TA repetitive sequence numbers in the promoter domain of the gene encoding the UGT1A1 enzyme is self-evident for those skilled in the art based on the above "suggestion". Such being the case, the "common matter" as described above cannot be regarded as "a contribution which each of the inventions as set forth in claim 1 and claim 5, considered as a whole, makes over the prior art".

Thus, there is no "special technical feature" between the invention as set forth in claim 1 and the invention as set forth in claim 5 in the meaning as defined in PCT Rule 13.2.

Next, discussion will be made on the inventions as set forth respectively in claims 5 and 9. The matter common to these inventions resides in "a method of estimating a risk of the expression of a side effect caused by the administration of a compound which is metabolized, either per se or as its metabolic intermediate, by UGT1A1 enzyme, which involves the step of analyzing polymorphisms in the structural gene part of the gene encoding the UGT1A1 enzyme". As stated above, the prior document suggested the utilization of polymorphisms not in the "structural gene part" but in the "promoter domain" of the gene encoding the UGT1A1 enzyme to establish the optimum treatment. Accordingly, the method of estimating the risk of the expression of the side effect caused by the administration of a compound metabolized, either per se or as its metabolic intermediate, by the UGT1A1 enzyme with the use of the polymorphisms in the "structural gene part" cannot be regarded as self-evident for those skilled in the art.

Such being the case, the "common matter" of the invention as set forth in claim 5 and the invention as set forth in claim 9 can be considered as a "special technical feature" in the meaning as defined in PCT Rule 13.2.

As discussed above, the present international application involves the following two groups of inventions:

(1) the inventions as set forth in claims 1 to 4, 12 to 16 (the parts not concerning claims 5 to 11), 17, 18, 21, 24 to 27 (the parts not concerning claims 22 and 23), 28 (in case being free from nucleic acid (b)) and 30 (in case being free from nucleic acid (b)); and

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10813

(2) the inventions as set forth in claims 5 to 11, 12 to 16 (the parts concerning claims 5 to 11), 19, 20, 22, 23, 24 to 27 (the parts concerning claims 22 and 23), 28 (in case containing nucleic acid (b)), 29 and 30 (in case containing nucleic acid (b)) and 31.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/09, A61K31/4745, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/09, A61K31/4745, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST(JOIS)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — Y	Iyer L. et al., Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism, Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1999, Vol. 65, No. 5, p. 576-582	1-4, 12-18, 21, 24-27 5-11, 19, 20, 22, 23, 28-31
X — Y	Ando Y. et al., UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, Annals of Oncology, 1998, Vol. 9, No. 8, p. 845-847	1-4, 12-18, 21, 24-27 5-11, 19, 20, 22, 23, 28-31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.02.02

国際調査報告の発送日

12.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y — A	Aono S. et al., Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome, The Lancet, 1995, Vol. 345, p. 958-959	5-16, 19, 20, <u>22-31</u> 1-4, 17, 18, 21
P X	Ando Y. et al., Polymorphisms of UDP-Glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis, Cancer Research, 2000.12.15, Vol. 60, p. 6921-6926	1-31
A	Maruo Y. et al., Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene, Pediatrics, 2000 Nov., Vol. 106, No. 5, e59	1-31

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件 (PCT規則13.1) は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである (PCT規則13.2)。

(特別ページに続く)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄の続き

まず、請求の範囲1及び請求の範囲5にそれぞれ記載された発明について検討する。両発明に共通する事項は、「UGT1A1酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法において、(a):UGT1A1酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域におけるTA反復配列数を解析するステップを含むこと」である。一方、先行文献をみると、そこには、UGT1A1酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域におけるTA反復配列数と、UGT1A1酵素によって代謝される化合物の一種であるイリノテカンの中間代謝物SN-38をUGT1A1酵素がグルクロニド化する活性との関連を解析した結果が記載されており、さらに、TA反復配列数を解析することにより、イリノテカンを用いる治療を適正化することができる可能性について示唆されている。

確かに、出願人が述べるように、治療の適正化に関して先行文献中になされているのは「示唆」ではあるけれども、その示唆は、TA反復配列数の増加とSN-38のグルクロニド化の低下が有意に関連していることを明確に示した上でなされた「示唆」であるし、そもそもこの種の研究は、得られた結果を個人レベルでの薬物による副作用の発現リスクの低減に役立てることを目的として行われるものであるから、UGT1A1酵素をコードする遺伝子のプロモータ領域におけるTA反復配列数を使用してUGT1A1酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法は、上記「示唆」に基づき、当該技術分野の専門家にとって自明な事項であるといえる。そうすると、上記「共通する事項」は、請求の範囲1及び請求の範囲5にそれぞれ記載された発明が全体として「先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴」ではない。

したがって、請求の範囲1に記載された発明と請求の範囲5に記載された発明との間に、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」は存在しない。

次に、請求の範囲5及び請求の範囲9にそれぞれ記載された発明について検討する。両発明に共通する事項は、「UGT1A1酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法において、UGT1A1酵素をコードする遺伝子の構造遺伝子部分における多型を解析するステップを含むこと」である。上で述べたように、先行文献に示唆されているのは、UGT1A1酵素をコードする遺伝子の「プロモータ領域」における多型を治療の適正化に利用することであって、「構造遺伝子部分」における多型ではなく、「構造遺伝子部分」の多型を利用してUGT1A1酵素によってそれ自体又は中間代謝物が代謝される化合物の投与による副作用発現リスクを予測する方法は、当該技術分野の専門家にとって自明な事項であるとはいえない。

そうすると、請求の範囲5に記載された発明と請求の範囲9に記載された発明との間の上記「共通する事項」は、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」であるといえる。

以上のように、本件国際出願の請求の範囲には、

- (1) 請求の範囲1-4, 12-16 (請求の範囲5-11に関連しない部分), 17, 18, 21, 24-27 (請求の範囲22, 23に関連しない部分), 28 (核酸(b)を含まない場合), 30 (核酸(b)を含まない場合)に記載された発明、及び、
- (2) 請求の範囲5-11, 12-16 (請求の範囲5-11に関連する部分), 19, 20, 22, 23, 24-27 (請求の範囲22, 23に関連する部分), 28 (核酸(b)を含む場合), 29, 30 (核酸(b)を含む場合), 31に記載された発明の2発明が記載されている。

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
25 October 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/79230 A3

- (51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/68, C12P 19/34, C07H 21/02, 21/04
- (21) International Application Number: PCT/US01/12273
- (22) International Filing Date: 13 April 2001 (13.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/197,514 18 April 2000 (18.04.2000) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): GENAIS-
SANCE PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; Five
Science Park, New Haven, CT 06511 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (*for US only*): CHEW, Anne
[US/US]; 1477 Beacon Street #64, Brookline, MA 02446
(US). CHOI, Julie, Y. [US/US]; 38 Elizabeth Street,
West Haven, CT 06516 (US). KOSHY, Beena [IN/US];
Apartment 11B, 1298 Hartford Turnpike, North Haven,
CT 06473 (US). ROUNDS, Eileen [US/US]; 40 Gold Star
Road, Cambridge, MA 02140 (US).
- (74) Agents: FIELD, Gisela, M. et al.; Genaisance Pharma-
ceuticals, Inc, Five Science Park, New Haven, CT 06511
(US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
21 March 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 01/79230 A3

(54) Title: HAPLOTYPES OF THE UGT1A1 GENE

(57) Abstract: Novel single nucleotide polymorphisms in the human UDP glycosyltransferase 1 (UGT1A1) gene are described. In addition, various genotypes, haplotypes and haplotype pairs for the UGT1A1 gene that exist in the population are described. Compositions and methods for haplotyping and/or genotyping the UGT1A1 gene in an individual are also disclosed. Polynucleotides containing one or more of the UGT1A1 polymorphisms disclosed herein are also described.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/12273

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C07H 21/02, 21/04

US CL : 435/6, 91.2; 536/22.1, 23.1, 24.1, 24.3, 24.31, 24.33

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6, 91.2; 536/22.1, 23.1, 24.1, 24.3, 24.31, 24.33

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EAST, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS

search terms: mutation, polymorphism, allelic, variant, alteration, missense, UGT1, UDP, glucuronosyl, bilirubin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 92/12987 A1 (UNITED STATES OF AMERICA) 06 August 1992, see entire document.	1-3, 7-9N
Y	WO 99/57322 A2 (AXYS PHARMACEUTICALS, INC.) 11 November 1999, see entire document.	1-3, 7-9
Y	ERPS et al. Identification of Two Single Base Substitutions in the UGT1 Gene Locus Which Abolish Bilirubin Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase Activity in Vitro. J. Clin. Invest. February 1994. Vol. 93. pages 564-570, see entire document.	1-3, 7-9
Y	MONAGHAN et al. Genetic Variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. Lancet. 02 March 1996. Vol. 347. pages 578-581, see entire document.	1-3, 7-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

31 JULY 2001

Date of mailing of the international search report

21 NOV 2001

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

JEFFREY FREEMAN

Telephone No. (703) 305-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/12273

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	BEUTLER et al. Racial variability in the UDP glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. July 1998. Vol. 95. pages 8170-8174, see entire document.	1-3, 7-9
Y	DATABASE Medline, US National Library of Medicine (Bethesda, MD USA), No. 20168627, "Genetic polymorphisms in uridine diphosphoglucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans", abstract, Guillemette et al., 15 February 2000.	1-3, 7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/12273

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-3, 7-9
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US01/12273

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

Groups 1-45, claim(s) 1-3, 7-9 in part, drawn to methods for haplotyping UGT1A1 comprising determining whether the individual has one of the UGT1A1 haplotypes shown in Table 4 or one of the haplotype pairs shown in Table 3. It is noted that Groups 1-45 correspond to the haplotypes of Table 4 and the haplotype pairs of Table 3, respectively. For example if Group 1 is elected, the claims 1-3 will be examined to the extent that they apply are limited to methods of haplotyping comprising a step of determining whether the individual has the first haplotype of Table 4 of the UGT1A1 gene. Upon election of one of the groups, please specify the Table and number of haplotypes requested.

Groups 46-50, claim(s) 4-6, in part drawn to a method for genotyping the UGT1A1 gene. It is noted that Groups 89-98 correspond to polymorphic sites PS1, PS2, and PS4-15, respectively. For example, if Group 89 is elected, the claims 4-6 will be examined to the extent that they apply are limited to method of genotyping comprising a step of identifying the nucleotide pair at PS2.

Groups 51-72, claim(s) 10-11, in part drawn to a method for predicting a haplotype pair for the UGT1A1 gene by identifying a UGT1A1 genotype for the individual at two or more polymorphic sites PS1, PS2, and PS4-15. It is noted that the claims encompass methods requiring identification of 21 possible combinations of two of the recited polymorphic sites, and that Groups 51-72 each correspond to one of these possible pairs, in the order recited in the claim.

Groups 73-117, claim(s) 12-13, in part drawn to a method for identifying an association between a trait and a haplotype between one of the 45 haplotypes and haplotype pairs of UGT1A1 gene. Groups 73-117 each correspond to one of the 45 particular combinations of the polymorphic sites, haplotypes, and the haplotype pairs encompassed by the claims (i.e., the 21 different haplotypes of Table 4, as well as the 24 different haplotype pairs of Table 3).

Groups 118-132, claim(s) 14-16, in part, drawn to a composition comprising at least one genotyping oligonucleotide for detecting a polymorphism in the UGT1A1 gene.

Group 133, claims 19-20, drawn to a kit comprising a set of oligonucleotides designed to genotype each of the polymorphic sites.

Groups 134-155, claims 21-22, 25 and 26, in part, drawn to a polynucleotide which is a polymorphic variant of a reference sequence for UGT1A1 gene or a fragment thereof.

Group 156-177, claim(s) 23-24 and 27-28, in part drawn to a recombinant nonhuman organisms comprising one of the 36 haplotypes respectively

Group 178-223, claim(s) 29, in part drawn to a computer system comprising polymorphism data wherein the data comprises the haplotypes shown in Table 4 and the haplotype pairs of Table 3.

Groups 224-244, claim(s) 30, in part, drawn to a genome anthologies comprising UGT1A1 isogenes having any one of the haplotypes of Table 4.

The products claimed in Claims 14-18, 21-22 include fragments of variant sequences, and the claims do not require, e.g., that the recited polymorphic sites be included in said fragments. Accordingly, the claims are sufficiently broad so as to encompass nucleic acid fragments taught in the art (see, e.g., admission of specification on page 3, Genbank Accession No. AC006985.1). As the products of Groups 118-132 and 134-155 do not represent a contribution over the prior art, the claims lack a special technical feature that is the same as or that corresponds to a special technical feature of the other claimed inventions. Thus, there is no special technical feature linking the recited Groups, as would be necessary to fulfill the requirement for unity of invention.

It is also noted that each of the present claims has been presented in improper Markush format, as distinct products and distinct methods are improperly joined in the claims. With respect to claims 4-11, 25-26, each polymorphic site and each molecule containing said polymorphic site is structurally and functionally distinct from and has a different special technical feature than each other polymorphic site and molecules containing said site. The chemical structure of each polymorphism and of each molecule containing the same differ from each other. For example, a polynucleotide comprising PS1 is chemically, structurally, and functionally different from a molecule comprising PS3. As the products and methods encompassed by the claims do not share a special technical feature, the distinct products and methods may not properly be presented in the alternative. Accordingly, the claims have been separated into a number of groups corresponding to the number of different inventions encompassed by the claims, and the claims will be examined only as they read upon the invention of the elected group. For the same reasons, the remainder of the claims have been separated in a number of groups corresponding to the number of different inventions encompassed thereby.

With particular respect to claims 7-9, Claims 11-13, Claim 29 and claim 30, it is noted that the haplotypes and genotypes encompassed by these claims are also distinct from each other and from the single polymorphisms recited in e.g., Groups 1-45. For example, a molecule of haplotype 1, comprising a particular combination of polymorphisms, differs chemically, structurally, and functionally from a molecule of haplotype 2 and from a molecule comprising a single polymorphism (e.g., PS1). The special technical feature of each haplotype or genotype is the combination of polymorphisms contained therein, which feature is lacking from and not shared with each other haplotype or genotype or with, e.g., a molecule comprising any single polymorphism set forth in the claims. Similarly, with respect to the pairs of polymorphism of Claim 10 (Groups 51-72), each combination of polymorphism differs from each other combination and from each of the other combinations discussed above (i.e., haplotypes, genotypes, and single polymorphic sites). Thus, the claims have been separated into a number of groups corresponding to the number of different inventions encompassed thereby, and the claims will be examined only as they read upon the invention of the elected group.

Further Groups 118-133 and 134-155 (polynucleotides, kits, and various compositions), Groups 156-177 (recombinant organisms), Groups 178-223 (computer system) and Groups 223-244 (genome anthologies) are additionally drawn to multiple, distinct products lacking the same or corresponding special technical features. The nucleic acids of Groups 118-133 and 134-155 are composed of nucleotides and function in, e.g., methods of nucleic acid hybridization or amplification. These groups are directed to different combinations of nucleic acids which are different from one another and may be employed in different methods. The recombinant organisms of Groups 156-177 are complex organisms that are employed in, e.g. animal research methods. Such organisms cannot be employed as, e.g., probes or primers and they differ in both structure and function from the nucleic acids of Groups 118-133 and 134-155. Further the computer system of Groups 178-223 are composed of, e.g., a CPU, a display

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/12278

device, an input device, etc., as recited in Claim 29, and function in, e.g., methods of electronic sequence comparison. As products of different sets of Groups differ from each other in structure, function, and effect, they do not belong to a recognized class of chemical compound, or have both a "common property or activity" and a common structure as would be required to show that the inventions are "of a similar nature".

Further, the methods of Groups 1-117 have different objectives and require different process steps. The methods of Groups 1-45 require steps of identifying haplotypes and haplotype pairs to achieve the objectives of haplotyping. The methods of Groups 46-50 require steps of identifying a single nucleotide on one gene copy to achieve the objective of genotyping. The methods of 51-72 require steps of identifying two polymorphisms in a gene to achieve the objective of "predicting a haplotype pair". The methods of 73-117 requires steps of comparing frequencies of haplotypes in a population to achieve the objective of "identifying an association between a trait" and a haplotype. In addition to differences in objectives, effects, and method steps, it is again noted that the claims of the present Groups are not directed to the detection or identification of molecules having the same or common special technical feature, for the reasons discussed above.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.